

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/042484 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 19/04,
C08B 37/06, A23L 1/0524, A61K 31/715, C08B 37/00

Mohammad [DE/DE]; Am Kinderbach 1, 67271 Kinden-
heim (DE). VOGEL, Manfred [DE/DE]; Am Höllpfad 1,
67271 Neuleiningen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13508

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. November 2001 (21.11.2001)

(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse
6A, 70469 Stuttgart (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, IL, JP, KR, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 57 976.0 22. November 2000 (22.11.2000) DE

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT
MANNHEIM/OCHSENFURT [DE/DE]; Maximil-
ianstrasse 10, 68165 Mannheim (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 16. Oktober 2003

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUNZ, Markwart
[DE/DE]; Kernerstrasse 8, 67550 Worms (DE). MUNIR,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/042484 A3

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PECTIN HYDROLYSIS PRODUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PEKTINHYDROLYSEPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing pectin hydrolysis products, pectin hydrolysis products which have
been thus produced, and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Pektinhydrolyseprodukten, die so her-
gestellten Pektinhydrolyseprodukte sowie Verwendungen derselben.

Internal Application No
PCT/EP 01/13508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/04 C08B37/06 A23L1/0524 A61K31/715 C08B37/00

B. FIELDS SEARCHED

IPC 7 C12P C08B A61K A23L

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 716 605 B (LAEVOSAN GMBH & CO KG) 19 June 1996 (1996-06-19) cited in the application page 2, line 1 -page 3, line 37; examples ----	1-41
A	DE 42 23 613 A (ZUCKERINDUSTRIE VEREIN) 20 January 1994 (1994-01-20) the whole document ----- -/--	1-11

☒ Patent family members are listed in annex.

'g' document member of the same patent family

14/02/2003

Döpfung, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 01/13508

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ENDRESS H-U ET AL: "MONITORING THE COURSE OF ENZYMIC DEGRADATION OF PECTIC SUBSTANCES BY AUTOMATED FAST ION CHROMATOGRAPHY FIC" LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, vol. 24, no. 1, 1991, pages 80-85, XP009003140 ISSN: 0023-6438 page 81, left-hand column, paragraph 1; figures 4,5; table 1 page 82, left-hand column, line 1 -page 83, left-hand column, line 3	1-8
X	page 83, left-hand column, line 1 - line 3; figures 4,5	9
X	----- KESTER H C ET AL: "Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 24 DEC 1999, vol. 274, no. 52, 24 December 1999 (1999-12-24), pages 37053-37059, XP002225691 ISSN: 0021-9258	9
A	the whole document	1-8
A	----- US 5 834 442 A (RAZ AVRAHAM ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) cited in the application the whole document -----	12,15-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP01/13508

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**see supplementary sheet (FURTHER INFORMATION
CONTINUED FROM PCT/ISA/210)**
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/13508

Continuation of I.1

Although Claims 12, 15-24 and 38-41 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 01/13508

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0716605	B	19-06-1996	DE 4330773 A1	16-03-1995
			AT 174222 T	15-12-1998
			AU 679262 B2	26-06-1997
			AU 7695694 A	27-03-1995
			CA 2171197 A1	16-03-1995
			CZ 9600708 A3	16-10-1996
			DE 59407457 D1	21-01-1999
			DK 716605 T3	16-08-1999
			WO 9507084 A1	16-03-1995
			EP 0716605 A1	19-06-1996
			ES 2127940 T3	01-05-1999
			GR 3029619 T3	30-06-1999
			HU 74431 A2	30-12-1996
			JP 9502195 T	04-03-1997
			PL 313393 A1	24-06-1996
			SK 32996 A3	05-03-1997
			US 5683991 A	04-11-1997
DE 4223613	A	20-01-1994	DE 4223613 A1	20-01-1994
US 5834442	A	10-11-1998	AU 695677 B2	20-08-1998
			AU 2944295 A	09-02-1996
			BR 9508245 A	30-09-1997
			CA 2194586 A1	25-01-1996
			CN 1157567 A	20-08-1997
			EP 0768885 A1	23-04-1997
			FI 965269 A	07-03-1997
			JP 11503715 T	30-03-1999
			NO 970039 A	17-02-1997
			WO 9601640 A1	25-01-1996
			US 5895784 A	20-04-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P19/04 C08B37/06 A23L1/0524 A61K31/715 C08B37/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C08B A61K A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 716 605 B (LAEVOSAN GMBH & CO KG) 19. Juni 1996 (1996-06-19) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 1 -Seite 3, Zeile 37; Beispiele	1-41
A	DE 42 23 613 A (ZUCKERINDUSTRIE VEREIN) 20. Januar 1994 (1994-01-20) das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Februar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Döpfer, K-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ENDRESS H-U ET AL: "MONITORING THE COURSE OF ENZYMIC DEGRADATION OF PECTIC SUBSTANCES BY AUTOMATED FAST ION CHROMATOGRAPHY FIC" LEBENSMITTEL-WISSENSCHAFT & TECHNOLOGIE, Bd. 24, Nr. 1, 1991, Seiten 80-85, XP009003140 ISSN: 0023-6438 Seite 81, linke Spalte, Absatz 1; Abbildungen 4,5; Tabelle 1 Seite 82, linke Spalte, Zeile 1 -Seite 83, linke Spalte, Zeile 3	1-8
X	Seite 83, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 3; Abbildungen 4,5	9
X	----- KESTER H C ET AL: "Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 24 DEC 1999, Bd. 274, Nr. 52, 24. Dezember 1999 (1999-12-24), Seiten 37053-37059, XP002225691 ISSN: 0021-9258	9
A	das ganze Dokument	1-8
A	----- US 5 834 442 A (RAZ AVRAHAM ET AL) 10. November 1998 (1998-11-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	12,15-41

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 01/13508

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 12, 15-24 und 38-41 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internat. Pat. Kennzeichen
 PCT/EP 01/13508

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0716605	B	19-06-1996	DE	4330773 A1	16-03-1995
			AT	174222 T	15-12-1998
			AU	679262 B2	26-06-1997
			AU	7695694 A	27-03-1995
			CA	2171197 A1	16-03-1995
			CZ	9600708 A3	16-10-1996
			DE	59407457 D1	21-01-1999
			DK	716605 T3	16-08-1999
			WO	9507084 A1	16-03-1995
			EP	0716605 A1	19-06-1996
			ES	2127940 T3	01-05-1999
			GR	3029619 T3	30-06-1999
			HU	74431 A2	30-12-1996
			JP	9502195 T	04-03-1997
			PL	313393 A1	24-06-1996
			SK	32996 A3	05-03-1997
			US	5683991 A	04-11-1997
DE 4223613	A	20-01-1994	DE	4223613 A1	20-01-1994
US 5834442	A	10-11-1998	AU	695677 B2	20-08-1998
			AU	2944295 A	09-02-1996
			BR	9508245 A	30-09-1997
			CA	2194586 A1	25-01-1996
			CN	1157567 A	20-08-1997
			EP	0768885 A1	23-04-1997
			FI	965269 A	07-03-1997
			JP	11503715 T	30-03-1999
			NO	970039 A	17-02-1997
			WO	9601640 A1	25-01-1996
			US	5895784 A	20-04-1999



①⑨ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 42 23 613 C 2**

⑤① Int. Cl.⁵:

C 12 P 19/12

C 07 H 3/08

C 12 P 19/04

②① Aktenzeichen: P 42 23 613.4-41

②② Anmeldetag: 17. 7. 92

④③ Offenlegungstag: 20. 1. 94

④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 7. 94

DE 42 23 613 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

Verein der Zuckerindustrie, 5300 Bonn, DE

⑦④ Vertreter:

Döring, R., Dr.-Ing.; Einsel, M., Dipl.-Phys., 38102
Braunschweig; Leonhard, R., Dipl.-Ing.; Fricke, J.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 80331 München

⑦② Erfinder:

Lieker, Heinz-Peter, Dipl.-Chem., 3300
Braunschweig, DE; Thielecke, Klaus, Dr., 3300
Braunschweig, DE; Buchholz, Klaus, Prof. Dr., 3300
Braunschweig, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DD 2 68 866 A1

EP 2 94 879 A2

ALBERSHEIM, et.al.: Helv. Chim. Acta 43(1960), 1422;

HASEGAWA u. NAGEL: J. Biol. Chem. 237(1962),
619;

LINHARDT, et.al.: Appl. Biochem. Biotech. 12, (1986),
135;

NAGEL u. WILSON: J. Chromatogr. 41(1969), 410;

HOTCHKISS et.al.: Carbohydr. Res. 215(1991), 81;

PRESTON u. RICE: Carbohydr. Res. 215(1991), 137;

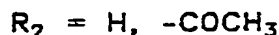
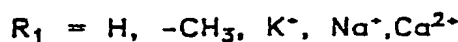
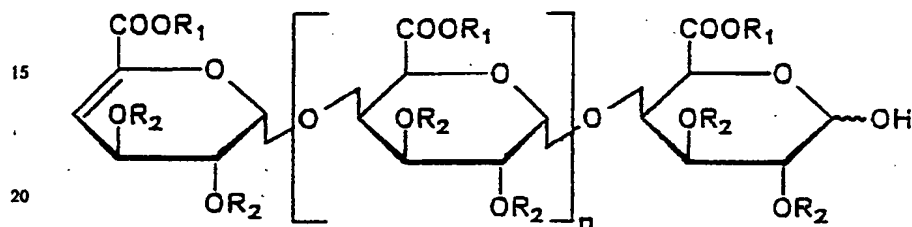
⑤④ Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Uroniden aus pektinhaltigen Stoffen

DE 42 23 613 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Uroniden (Oligogalacturonsäuren) aus pektinhaltigen Stoffen unter Einsatz von Fermentation und Isolieren der entstandenen ungesättigten Uronide durch Fällung und/oder chromatographische Verfahren.

Pektinstoffe kommen in vielen Pflanzen als Bausteine für das Zellwandgerüst vor. Sie können von pektolytischen Enzymen, den sogenannten Lyasen, zu niedermolekularen ungesättigten Uroniden abgebaut werden, vgl. Albersheim et al. *Helv. Chim. Acta* 43 (1960) 1422. Dabei wird das Grundgerüst des Pektins nach Überführung in die entesterte Form (als Pektinsäure oder Polygalacturonsäure) in der Weise in kurzketige Untereinheiten gespalten, daß an der vormaligen Verknüpfungsstelle eine Doppelbindung entsteht:



Durch Umsetzung von sogenannter niedermolekularer Pektinsäure aus Citrus-Pektin mit Pektatlyase wurde eine ungesättigte Verbindung isoliert und als O-(4-Desoxy-L-threohexopyranos-4-enyluronsäure)-(1→4)-D-galacturonsäure charakterisiert, vgl. Hasegawa und Nagel, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 619.

Im Laufe der Zeit ist über die Gewinnung von verschiedenen Pektatlyase-Typen aus Bakterien und Pilzen berichtet worden, vgl. Linhardt et al., *Appl. Biochem. Biotech.* 12 (1986) 135.

Auch die Isolierung der ungesättigten Reaktionsprodukte wurde bereits beschrieben und zwar wurde Anionenaustauschchromatographie von Nagel und Wilson, *J. Chromatogr.* 41 (1969) 410 und präparative Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) von Hotchkiss et al., *Carbohydr. Res.* 215 (1991) 81 vorgeschlagen.

Die Reaktions- und Produktkontrolle erfolgt vorzugsweise mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie, vgl. Preston and Rice, *Carbohydr. Res.*, 215 (1991) 137-145.

Die Herstellung der o.g. ungesättigten Pektinsäure- (Polygalacturonsäure-) Spaltprodukte erfolgt daher in der Praxis in 4 Schritten, wobei die Verfahren mit Reinkulturen durchgeführt werden.

Es wird in einem ersten Schritt zunächst das Enzym gewonnen (als Pektatlyase-Präparat bzw. Rohpräparat), etwa durch sterile Fermentation vorgereinigter Pektinpräparate mit Reinkulturen von Bakterien bzw. Pilzen, z. B. *Bacillus* sp.

In einem zweiten Schritt wird aus Reststoffen der Citrus- oder Apfelsaftherstellung gewonnenes recht kostenintensives reines Pektin benutzt und durch saure Hydrolyse Pektinsäure bzw. Polygalacturonsäure hergestellt.

Diese beiden Substanzen (Polygalacturonsäure und Pektatlyase) werden nunmehr in gepuffertem, wäßrigem Medium zur Reaktion gebracht.

Es entstehen ungesättigte Uronide, auch als ungesättigte Oligogalacturonsäuren bezeichnet. Sie werden abschließend noch durch chromatographische Verfahren isoliert.

Diese Form der Herstellung ungesättigter Uronide ist aufwendig und darüber hinaus mit hohen Kosten verbunden. Die Gewinnung der Enzyme ist kompliziert und kostspielig.

Außerdem müssen gereinigte Pektin-Substrate benutzt und die Fermentation steril durchgeführt werden, so daß außerdem hohe Investitionskosten für die dafür notwendigen Fermentationseinrichtungen anfallen. Außerdem erfordert die aerob durchgeführte Fermentation einen hohen Energieaufwand zur Belüftung des Fermenters.

Die Verwendung der ungesättigten Uronide und ihrer homologen Oligomeren wird zunehmend interessanter, so wurde die Verwendung als pharmazeutisches Präparat zur Prophylaxe und Therapie in der Medizin bei Intoxikation mit toxischen Schwermetallen in der DD 268 866 A1 vorgeschlagen und in der EP 0 294 879 A2 ihre Verwendung als Reaktionskomponente für die Michael-Addition angeregt.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein kostengünstigeres Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Uroniden aus pektinhaltigen Stoffen vorzuschlagen.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß der pektinhaltige Stoff mit einer das Entstehen des Enzyms Pektatlyase fördernden Bakterienkultur versetzt und anaerob fermentiert wird, daß die Fermentation während des Vorgangs abgebrochen wird, daß nach dem Abbruch die entstandene Fermentationsflüssigkeit von Bakterien befreit und eine katalytische Reaktion des entstandenen Enzyms Pektatlyase in der Fermentationsflüssigkeit mit der ebenfalls entstandenen Polygalacturonsäure gefördert wird.

Mit diesem Verfahren können als Ausgangsmaterialien Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie mit sehr niedrigem Preis, wie extrahierte Zuckerrübenschnitzel oder Kartoffelpülpe, ohne weitere Vorbehandlung verwendet werden. Da diese Ausgangsmaterialien zunehmend anfallen und ihre anderweitige Verwendung oder

auch ihre Beseitigung als Abfall zunehmend erschwert ist, wird auf diese Weise zugleich eine Möglichkeit geschaffen, diese Nebenprodukte sinnvoll weiterzuverarbeiten.

Das erfindungsgemäße Verfahren macht sich zunutze, daß die pektinhaltigen Rohmaterialien sowohl zur Bildung der Polygalacturonsäure als auch des Enzyms Pektatlyase herangezogen werden können. Nach Durchführung einer geeigneten Fermentation liegen sie auch beide in der Fermentationsflüssigkeit, einer Kulturbühe, vor. Dadurch wird die Anzahl der Verfahrensschritte bis zum biokatalytischen Abbau des Rohmaterials erheblich reduziert, zusätzlich wird eine ganze Anzahl von Reinigungsschritten und sonstigen Manipulationen bei den Vorprodukten überflüssig.

Darüber hinaus können unsteril/anaerob, also auf besonders kostengünstige Weise gewonnene Biokatalysatoren eingesetzt werden. Gegenüber aus der Literatur bekannten Verfahren werden weit kostengünstigere Substrate und Enzyme eingesetzt und weniger und einfachere Verfahrensstufen angewendet, so daß alle Voraussetzungen für die brauchbare Anwendung des Verfahrens im technischen Bereich gegeben sind.

Verfahren zur Mischenzymproduktion mit bakteriellen Mischkulturen durch Umsetzung von polysaccharidhaltigen Substraten wie Extraktionsrückständen der Nahrungsmittel- und Zuckerindustrie sind schon von Buchholz et al., Zuckerind. 113 (1988) 204, vorgeschlagen worden. Diese bakteriellen Mischkulturen können auch hier eingesetzt werden.

Die Erfindung macht es sich zunutze, daß bei dem verwendeten Fermentationsprozeß die Konzentration von gelöster Polygalacturonsäure einen Maximalwert erreicht und zwar zu einem Fermentationszeitpunkt, an dem die zweite notwendige Reaktionskomponente, das Pektatlyase-Rohenzym, ebenfalls im Fermentationsprozeß fast ihren endgültigen Maximalwert erreicht hat.

Dadurch wird es möglich, Polygalacturonsäure und das Enzym Pektatlyase gleichzeitig in einer einstufigen Reaktion als Substrat und Enzym zu erzeugen. Dazu werden z. B. Rübenpreßschnitzel mittels Bakterienmischkulturen anaerob fermentiert.

Am Maximum der Konzentration von gelöster Polygalacturonsäure sowie einer bereits sehr hohen Enzymaktivität wird die Fermentation zunächst abgebrochen und die Kulturbühe von Feststoffen und Bakterien, etwa durch Mikrofiltration, befreit. Die Lösung wird anschließend mit Hilfe einer Querstrom-Ultra-Filtrationseinheit konzentriert.

Die entstehende konzentrierte Lösung wird nun auf Bedingungen eingestellt, die für die Lyase-Reaktion günstig sind, dies ist etwa ein pH-Wert von 8 und eine Temperatur von 37°C. Unter diesen Bedingungen bilden sich die gewünschten ungesättigten Uronide.

Dabei entstehen zunächst bevorzugt Tetramere und Pentamere, bei länger andauernder Reaktion jedoch zunehmend Trimere und letztlich Dimere. Wie sich gezeigt hat, sind vor allem Dimere, aber auch noch Trimere flexibler einsetzbar und sollten daher bevorzugt hergestellt werden.

Werden aus bestimmten Gründen gerade Tetramere, Pentamere oder Trimere als Reaktionsprodukt gewünscht, so kann einfach die Reaktion zu dem entsprechend gewählten Zeitpunkt abgebrochen werden, um ein anderes Zusammensetzungsverhältnis in der Mischung zu erhalten.

Nach Abschluß der Reaktion wird die Reaktionslösung durch bekannte chromatographische Verfahren aufgearbeitet.

Das Verfahren wird besonders kostengünstig, wenn als pektinhaltige Stoffe pflanzliche Gerüstsubstanzen eingesetzt werden, wie erwähnt besonders bevorzugt Zuckerrübenschnitzel oder Kartoffelpüpe.

Die Fermentation läuft vorzugsweise bei einem pH-Wert von 6 bis 7, vorzugsweise von 6,5. Sie sollte bei einer Temperatur von 30 bis 40°C, vorzugsweise bei 35°C, durchgeführt werden.

Die entstandene Fermentationslösung (Kulturbühe) wird bevorzugt nach dem Abbrechen mittels eines Mikrofilters von Bakterien und Feststoffen befreit und/oder mittels einer Querstrom-Ultra-Filtrationseinheit konzentriert.

Die weitere Umsetzung der Polygalacturonsäure in der Fermentationsflüssigkeit mittels des Enzyms Pektatlyase erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 25 und 45, insbesondere 37°C.

Dabei sollte ein pH-Wert zwischen 6 und 9, insbesondere bei 8, eingehalten werden.

Der Umsetzungsprozeß sollte mehr als 6 Stunden, vorzugsweise 24 Stunden, durchgeführt werden, um einen möglichst hohen Gehalt an Uronid-Dimeren zu erhalten.

In bestimmten Fällen empfiehlt es sich, ein technisch weniger günstiges, dafür aber zu höheren Ausbeuten führendes abgewandeltes Verfahren zu bevorzugen. Es dient z. B. zur Gewinnung von Standardsubstanzen, die für die Kontrolle des Gewinnungsprozesses dienen. Da hier wirtschaftliche Gesichtspunkte nur eine untergeordnete Rolle spielen, wird diese aufwendigere Verfahrensvariante angewendet.

Sie zeichnet sich dadurch aus, daß die anaerobe Fermentation so durchgeführt wird, daß unterschiedliche Fermentationsflüssigkeiten entstehen, vorzugsweise durch Abbrechen der Fermentation zu unterschiedlichen Zeitpunkten und daß anschließend das weitere Verfahren mit einer Mischung aus den beiden Fermentationsflüssigkeiten fortgesetzt wird.

Durch diese Verfahrensmaßnahme können beide Reaktionskomponenten im wesentlichen gleich hergestellt, aber zu unterschiedlichen Abbruchszeiten zu ihrem jeweiligen, nicht exakt identischen Maximalwert gewonnen werden.

Dabei wird in der einen Fermentationslösung, die optimal auf die Gewinnung auf Polygalacturonsäure ausgerichtet ist, keine Ultrafiltration durchgeführt. Dadurch werden auch Polygalacturonsäurebruchstücke mit einem Molekulargewicht unterhalb von 3000 der anschließenden Enzymreaktion zugänglich.

Im folgenden wird anhand zweier Beispiele das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert. Die Zeichnung dient dabei zur Erläuterung.

Es zeigt:

Fig. 1 den zeitlichen Verlauf der Fermentation; aufgetragen sind Pektatlyase-Aktivität und Polygalacturon-

säureanteil; und

Fig. 2 den zeitlichen Verlauf der Lyasereaktion; aufgetragen ist die Konzentration der verschiedenen ungesättigten Oligogalacturonsäuren.

Es wird zunächst in einem Beispiel die Reaktionsführung für die Bildung eines ungesättigten Diuronids beschrieben.

Zunächst wird diskontinuierlich aber gleichzeitig das Enzym Pektatlyase sowie das Substrat Polygalacturonsäure hergestellt.

In einem 150-l-Rührfermenter mit Blattrührer, der 200 mm Durchmesser besitzt und mit einer Drehzahl von 120 U/min betrieben wird, werden 140 l Leitungswasser und 14 kg feuchte Rübenpreßschnitzel (5,2 kg Trockensubstanz) gegeben und mit Inoculum angeimpft. Als Inoculum (Starterkultur) dient ein an das Substrat angepaßter Versäuerungsschlamm. Dieser wird dadurch gewonnen, daß Bakterienschlamm aus einer anaeroben Abwasserreinigung (Herkunft, z. B. kommunale Kläranlage) in einer Konzentration von 0,5 kg Trockenmasse je Liter Flüssigkeit mit Rübenpreßschnitzeln bei einem Feststoffgehalt von 20 g Trockensubstanz je Liter bei 35 bis 40°C 48 Stunden fermentiert wird. Nach dem Abtrennen des groben Feststoffes enthält der Überstand eine

Bakterientrockensubstanz von 1 bis 2 g je Liter Suspension.

Die Fermentation wird durch Zugabe von 1 Liter Inoculum gestartet und unter Luftabschluß durchgeführt. Die Fermentation erfolgt bei 35°C und einem pH-Wert von 6,5, der automatisch durch Zugabe von 25%iger Natronlauge korrigiert wird. Nach einer Lag-Phase von ca. 10 Stunden beginnen die Mikroorganismen, die gewünschten Enzyme in das Medium auszuschcheiden.

Wie Fig. 1 zeigt, ist nach etwa 38 Stunden das Maximum an Substrat (Polygalacturonsäure) in Lösung erreicht, ein weiteres Fermentieren würde den Polygalacturonsäureanteil relativ schnell wieder abfallen lassen.

Zum gleichen Zeitpunkt ist praktisch das Maximum der Enzymaktivitäten ebenfalls schon erreicht.

Zu diesem Zeitpunkt (nach 38 Stunden) enthält die Kulturbrühe bzw. Kulturflüssigkeit eine Pektatlyaseaktivität von 3,5 nkat/ml und eine Konzentration von Polygalacturonsäure von 2,0 g/l.

An dieser Stelle wird daher die Fermentation abgebrochen.

Aus dem Fermenter wird die Fermentationsflüssigkeit abgezogen, grob gefiltert sowie nachfolgend mit Hilfe einer Querstrom-Mikrofiltrationseinheit mit einer Ausschlußgrenze von 0,2 µm von Bakterien und Feststoff befreit, gesammelt und über eine Ultrafiltrationseinheit (Prinzip "hollow fiber") mit einer Ausschlußgrenze von 3000 g/mol konzentriert.

Die Fermentationslösung enthält nun das Enzym Pektatlyase als auch das Substrat Polygalacturonsäure. Diese beiden Reaktionskomponenten werden nunmehr zu ungesättigter Digalacturonsäure verarbeitet, also zu (O-(4-Desoxy-L-threo-hexopyranosido-4-enyluronsäure)-(1-4)-D-galacturonsäure).

Hierzu werden 50 ml des Konzentrats (Konzentrierungsfaktor 10) auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und bei 37°C inkubiert. Die Bildung der ungesättigten Digalacturonsäure wird mittels Hochleistungsanionenaustausch-Chromatographie (HPAEC) verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion, etwa nach 24 Stunden, wird die Reaktionslösung aufgearbeitet.

Wird die Reaktion vor dem Ablauf von 24 Stunden gestoppt, vgl. Fig. 2, entstehen nicht die gewünschten Dimere, sondern länger-kettige ungesättigte Uronide.

Es folgt jetzt noch die Produktisolierung.

Das Reaktionsgemisch wird zur Abtrennung von kationischen und neutralen Begleitstoffen über eine Anionenaustauschersäule (Amberlite IRA 400, Formiat-Form, Bettvolumen 65 cm³) gegeben. Die auf dem Harz verbleibenden anionischen Produkte werden nach einem Waschvorgang (500 ml H₂O) mit 500 ml 0,2 m Natriumformiatlösung (pH 4,7) eluiert. Das Produkt wird durch Zugabe von 150 mg Sr(NO₃)₂ und 6 Vol. Ethanol aus der Pufferlösung ausgefällt. Nach Zentrifugation wird das Präzipitat in wenig Wasser gelöst und über eine Kationenaustauschersäule (Amberlite IR 120, Bettvolumen 65 cm³) gegeben. Nach Gefriertrocknung des Eluats erhält man 250 mg ungesättigte Digalacturonsäure. Das entspricht einer Ausbeute von 25% bezogen auf Polygalacturonsäure in Lösung (Reinheit 80%, mit HPLC bestimmt).

Eine weitere Aufreinigung (95% Reinheit) gelingt mittels präparativer HPLC. Dazu werden 250 mg des Präparats (80%ige Reinheit) auf eine präparative Hochleistungssäule (NH₂-Phase, 25 x 3,2 cm) gegeben und mit 0,11 m Natriumacetatlösung, pH 6,5 bei einer Fließrate von 25 ml/min eluiert. Das Produkt wird durch Zusatz von 150 mg Sr(NO₃)₂ und 6 Vol. Ethanol ausgefällt. Nach Zentrifugation wird das Präzipitat in wenig Wasser gelöst und über eine Kationenaustauschersäule (Amberlite IR 120, Bettvolumen 65 cm³) gegeben. Nach Gefriertrocknung erhält man 210 mg ungesättigte Digalacturonsäure (95%ige Reinheit).

In einem zweiten Beispiel sei noch die Gewinnung von Standardsubstanzen für die Chromatographie erläutert. Die Ausbeute kann um den Faktor 2 erhöht werden, wenn Enzym- und Substratherstellung zwar grundsätzlich wie im ersten Beispiel, jedoch in zwei Fermentationen durchgeführt werden, um jeweils einzeln aufeinander abgestimmte optimale Zusammensetzungen zu erhalten.

Darüber hinaus wird die Substratlösung ohne Ultrafiltration hergestellt. Dabei werden auch Polygalacturonsäurebruchstücke mit einem Molekulargewicht von weniger als 3000 der anschließenden Enzymreaktion zugänglich.

Die Umsetzung der Substratlösung mit der Enzymkonzentratlösung erfolgt so, daß 200 ml der Substratlösung auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt werden. Nach Zugabe von 2 ml der Enzymkonzentratlösung wird die Reaktionslösung 30 Stunden bei 37°C inkubiert.

Schließlich erfolgt die Aufarbeitung wie im ersten Beispiel. Man erhält 200 mg ungesättigter Digalacturonsäure. Das entspricht einer Ausbeute von 50% bezogen auf Polygalacturonsäure in Lösung.

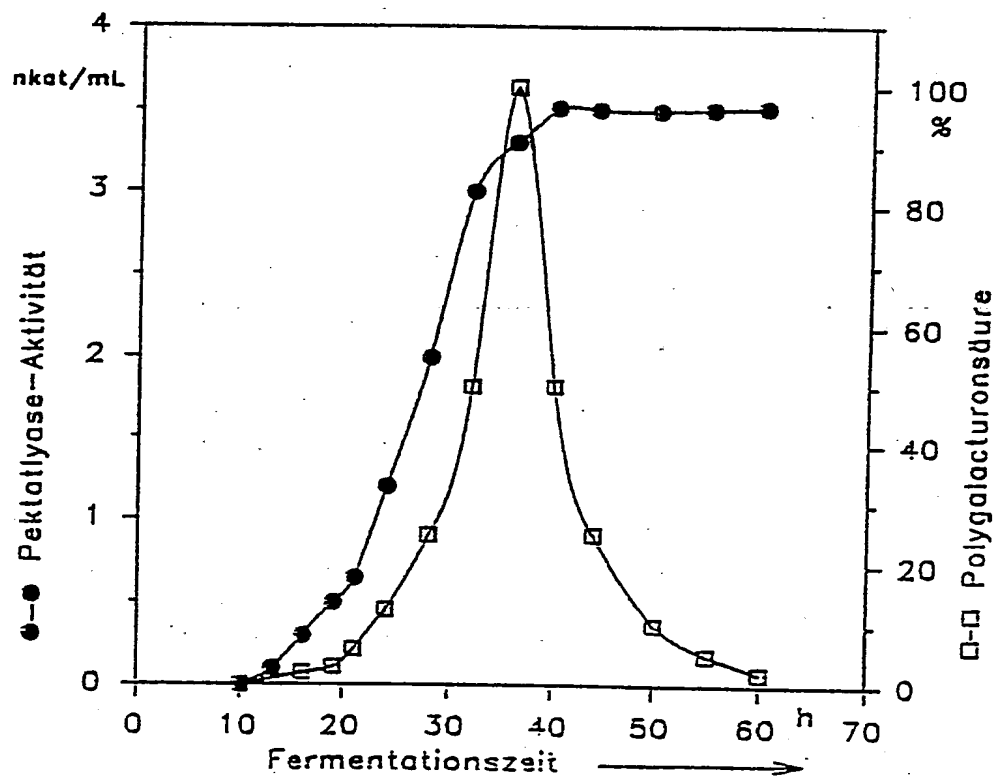
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Uroniden aus pektinhaltigen Stoffen unter Einsatz von Fermentation und Isolieren der entstandenen ungesättigten Uronide durch Fällung und/oder chromatographische Verfahren, **dadurch gekennzeichnet**,
daß der pektinhaltige Stoff mit einer das Entstehen des Enzyms Pektatlyase fördernden Bakterienkultur versetzt und anaerob fermentiert wird,
daß die Fermentation während des Vorgangs abgebrochen wird,
daß nach dem Abbruch die entstandene Fermentationsflüssigkeit von Bakterien befreit und eine katalytische Reaktion des entstandenen Enzyms Pektatlyase in der Fermentationsflüssigkeit mit der ebenfalls entstandenen Polygalacturonsäure gefördert wird. 5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als pektinhaltige Stoffe pflanzliche Gerüstsubstanzen einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als pflanzliche Gerüstsubstanzen Zuckerrübenschnitzel oder Kartoffelpülpe einsetzt. 15
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei einem pH-Wert von 6 bis 7, vorzugsweise 6,5, durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei 30° bis 40° C, vorzugsweise bei 35° C, durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation im Bereich der maximalen Konzentration von gelöster Polygalacturonsäure abgebrochen wird. 20
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation nach 35 bis 40 Stunden, vorzugsweise nach 38 Stunden, abgebrochen wird.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die entstandene Fermentationsflüssigkeit nach dem Abbrechen mittels Mikrofiltration von Bakterien und Feststoffen befreit wird. 25
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die entstandene Fermentationsflüssigkeit nach dem Befreien von Feststoffen und Bakterien durch eine Querstrom-Ultrafiltrationseinheit konzentriert wird.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung der Polygalacturonsäure mittels des Enzyms Pektatlyase bei einer Temperatur zwischen 25° und 45° C, vorzugsweise 37° C, erfolgt. 30
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung der Polygalacturonsäure mittels des Enzyms Pektatlyase bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9, vorzugsweise 8, erfolgt. 35
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Umsetzungsprozeß der Polygalacturonsäure mittels des Enzyms Pektatlyase mehr als 6 Stunden, vorzugsweise 24 Stunden, durchgeführt wird.
13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung der ungesättigten Uronide durch Fällung und/oder säulenchromatographische Verfahren erfolgt. 40
14. Abänderung des Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch Abbrechen der Fermentation zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Fermentationsflüssigkeiten gewonnen werden und
daß anschließend das weitere Verfahren mit einer Mischung aus beiden Fermentationsflüssigkeiten fortgesetzt wird. 45

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1



Figur 2

